

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



10/532617



(43) 国際公開日
2004年5月6日 (06.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/038009 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 1/14 (74) 代理人: 森田 憲一 (MORITA, Kenichi); 〒173-0004 東京都板橋区板橋二丁目6番8号板橋中央ビル5階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013657
- (22) 国際出願日: 2003年10月24日 (24.10.2003) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-311840
2002年10月25日 (25.10.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 呉羽化学工業株式会社 (KUREHA CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8552 東京都中央区日本橋堀留町一丁目9番11号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 北郷 宏幸 (KITAGOU, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒979-0141 福島県いわき市 勿来町窪田酒井原 2 0-1 0 Fukushima (JP). 大友 信夫 (OOTOMO, Nobuo) [JP/JP]; 〒979-0145 福島県いわき市 勿来町四沢作田 4-8 4 Fukushima (JP). 根本 康光 (NEMOTO, Yasumitsu) [JP/JP]; 〒974-8232 福島県いわき市 錦町台 5 0 Fukushima (JP). 高橋 栄作 (TAKAHASHI, Eisaku) [JP/JP]; 〒300-3261 茨城県つくば市 花畑 3-9-1 5 Ibaraki (JP). 日渡 淳二 (HIWATASHI, Junji) [JP/JP]; 〒974-8212 福島県いわき市 東田町 1-2 0-1 Fukushima (JP). 松永 謙一 (MATSUNAGA, Kenichi) [JP/JP]; 〒359-1142 埼玉県所沢市 大字上新井 9 8 9-1 7 Saitama (JP).
- 規則4.17に規定する申立て:
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) PROCESS FOR PRODUCING MATSUTAKE MUSHROOM MYCELIUM

(54) 発明の名称: マツタケ菌糸体の製造方法

(57) Abstract: A process for producing matsutake mushroom mycelium involving the step of culturing matsutake mushroom mycelium on a small scale in a liquid medium under agitation without aerating or aerating at a low rate of less than 0.05 vvm. According to this method, matsutake mushroom mycelium can be produced in a large amount without damaging its physiological activity.

(57) 要約: 小スケール培養において、液体培地中に通気を行なわない条件下又は0.05vvm未満の低通気条件下で、マツタケ菌糸体を攪拌培養する工程を含む、マツタケ菌糸体の製造方法を開示する。前記製造方法によれば、生理活性を損なうことなく、マツタケ菌糸体を大量に製造することができる。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/038009 A1

明 細 書

マツタケ菌糸体の製造方法

技術分野

本発明は、マツタケ菌糸体の製造方法に関する。特に、マツタケ菌糸体の大量製造の母菌として利用可能なマツタケ菌糸体を製造し、これを利用して、マツタケ菌糸体を大量に製造する方法に関するものである。

背景技術

国際公開第WO 02/30440号パンフレット（特許文献1）の27ページには、マツタケ菌糸体の乾燥粉末をストレス負荷回復促進に利用する提案がなされている。

マツタケ菌糸体の製造方法に関して、特公昭第61-53032号公報（特許文献2）の実施例1には、マツタケ菌の斜面寒天培養物を、デンプン類を含む液体培地中で、30日間振盪培養し、更に、デンプン類を含む液体培地20Lに接種して、30日間通気攪拌培養して、マツタケ菌糸体を製造する方法が記載されている。

更に、特開平第11-318433号公報（特許文献3）の実施例1には、市販のマツタケ子実体から分離した菌糸体を4日間平板培養し、野菜抽出物を含有する液体培地で4日間馴化培養し、更に、野菜抽出物を含有する液体培地2Lを加えた5Lの深層通気攪拌培養槽を用いて、6日間培養することにより、マツタケ菌糸体を製造できることが記載されている。

しかしながら、マツタケ菌糸体の大量製造に関して、生理活性を損なうことなく、大量製造を可能にする新たな提案が待望されている。

（特許文献1）国際公開第2002-30440号公報

（特許文献2）特公昭第61-53032号公報

（特許文献3）特開平第11-318433号公報

発明の開示

本発明は、マツタケ菌糸体の大量製造の母菌として利用可能なマツタケ菌糸体を製造し、これを利用して、生理活性を損なうことなく、マツタケ菌糸体を大量に製造する方法を提供することを目的とするものである。

本発明者は、鋭意研究を行なった結果、マツタケ菌糸体を、小スケール培養において、液体培地中に通気を行なわない条件下又は低通気条件下で攪拌培養する（好ましくは、前記攪拌培養に用いるマツタケ菌糸体を、予め、固形培地又は液体培地で、培養又は保存したマツタケ菌を種株として、所定の期間、静置液体培養し、次いで振盪培養する）ことにより、マツタケ菌糸体の量産に適したマツタケ菌の母菌が得られること、及び前記母菌を深部培養（例えば、深部攪拌培養）することにより、効率的にマツタケ菌糸体を量産できるという知見を得るに到った。

従って、本発明は、

〔１〕小スケール培養において、液体培地中に通気を行なわない条件下又は 0.05 vvm 未満の低通気条件下で、マツタケ菌糸体を攪拌培養する工程（以下、非通気攪拌培養と称する）を含む、マツタケ菌糸体の製造方法；

〔２〕前記攪拌培養の前培養工程として、

（１）マツタケ菌糸体を静置液体培養する工程、

（２）マツタケ菌糸体を振盪培養する工程、あるいは、

（３）マツタケ菌糸体を静置液体培養し、続いて、前記静置液体培養で得られたマツタケ菌糸体を用いて振盪培養する工程

のいずれか１つの工程を更に含む、〔１〕の製造方法；

〔３〕前記攪拌培養工程における培養液単位体積あたりの攪拌所要動力が $0.01 \sim 2 \text{ kW/m}^3$ である、〔１〕又は〔２〕の製造方法；

〔４〕マツタケ菌糸体を静置液体培養し、続いて、前記静置液体培養で得られたマツタケ菌糸体を用いて振盪培養する工程を含む、マツタケ菌糸体（特にはマツタケ菌糸体の製造用母菌）の製造方法；

〔５〕〔１〕～〔４〕の製造方法で得られたマツタケ菌糸体を製造用母菌に用いて、深部培養する工程を含む、マツタケ菌糸体の製造方法；

〔６〕静置液体培養の期間が $30 \sim 400$ 日間である、〔２〕～〔５〕の製造方法；

〔7〕振盪培養の期間が5～50日間である、〔2〕～〔6〕の製造方法；
〔8〕接種時拡大倍率2～50倍の拡大培養である、〔1〕～〔7〕の製造方法；
〔9〕培養液の浸透圧を0.01～0.8MPaに調製した培地を用いる、〔1〕～〔8〕の製造方法；

〔10〕初発菌糸体に含有されるファイバー状菌糸体の初発菌糸体濃度が0.05g/L以上である、〔1〕～〔9〕の製造方法に関する。

前記〔5〕の製造方法における前記深部培養工程の好ましい態様によれば、〔1〕～〔3〕の製造方法で得られたマツタケ菌糸体を製造用母菌に用いて、大スケール培養にて深部培養する。

更に、本発明は、固形培地又は液体培地で、培養又は保存したマツタケ菌を、静置液体培養し、次いで、振盪培養することを特徴とする、マツタケ菌糸体の製造方法に関する。

更に、本発明は、固形培地又は液体培地で、培養又は保存したマツタケ菌を、静置液体培養、次いで、振盪培養、更に、100L未満の小型培養装置を用い、液体培地中に通気を行なわない攪拌培養を行なうことを特徴とする、マツタケ菌糸体の製造方法に関する。

更に、本発明は、固形培地又は液体培地で、培養又は保存したマツタケ菌を、静置液体培養、次いで、振盪培養、更に、100L未満の小型培養装置を用い、液体培地中に通気を行なわない攪拌培養を行い製造したマツタケ菌糸体を製造用母菌に用いて、100L以上の中型又は大型培養装置で、深部培養によりマツタケ菌糸体を製造する方法に関する。

本明細書において、用語「小スケール培養」及び「大スケール培養」とは、微生物の大量培養で一般的に行われている段階的培養方法、すなわち、培養液量の少ない小スケールの培養から、順次、培養液量の多いスケールの培養へ移行する周知培養方法における用語「小スケール培養」及び「大スケール培養」を意味する。従って、「小スケール」及び「大スケール」の各範囲は、必ずしも具体的な培養液量で絶対的に規定されるものではなく、例えば、スケールアップの手順（特には培養装置の容積）に応じて適宜決定することのできる、相対的な概念である。

また、本明細書で用いる用語「小型培養装置」及び「大型培養装置」も、同様に、具体的な容積で絶対的に規定されるものではなく、例えば、スケールアップの手順（特には培養スケール）に応じて適宜決定することのできる、相対的な概念である。

なお、これらの好適範囲については、後述する各培養工程において詳述する。

また、本明細書中では、発明の理解を容易にするため、必要に応じて次のように記載する。

マツタケ菌の種株又はマツタケ菌の菌株をマツタケ菌Ⅰと記載する。

マツタケ菌Ⅰを固形培地又は液体培地で、培養又は保存したマツタケ菌を、マツタケ菌Ⅱと記載する。

マツタケ菌Ⅱを静置液体培養して得られるマツタケ菌を、マツタケ菌Ⅲと記載する。

マツタケ菌Ⅲを振盪培養して得られるマツタケ菌を、マツタケ菌Ⅳと記載する。

マツタケ菌Ⅳを、小スケール培養において、あるいは、小型培養装置（例えば、容積100L未満の小型培養装置）を用いて、培養液中に通気を行なわない条件下又は低通気条件下で攪拌培養を行い得られるマツタケ菌を、マツタケ菌Ⅴと記載する。

マツタケ菌Ⅴを、大スケール培養において、あるいは、大型培養装置（例えば、容積100L以上の大型培養装置）を用いて、深部培養して得られるマツタケ菌を、マツタケ菌Ⅵと記載する。

マツタケ菌Ⅵ、大スケール培養において、あるいは、大型培養装置（例えば、容積100L以上の大型培養装置）を用いて、深部培養して得られるマツタケ菌を、マツタケ菌Ⅶと記載する。

更に、マツタケ菌Ⅶ、大スケール培養において、あるいは、大型培養装置（例えば、~~容積~~100L以上の大型培養装置）を用いて、深部培養して得られるマツタケ菌を、マツタケ菌Ⅶと記載する。

図面の簡単な説明

図1は、デンプン、グルコース、及びリン酸二水素カリウム等を含む培地を使用し、培養スケールが200L培養槽であり、培養温度が $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ である条件下で

培養を実施した、攪拌所要動力と生育の関係を示すグラフである。グラフ中の各記号「黒丸」、「黒四角」、及び「黒三角」は、それぞれ、攪拌所要動力が 0.12 kW/m^3 、 1.1 kW/m^3 、及び 2.6 kW/m^3 の場合の結果である。

図2は、デンプン、グルコース、及びリン酸二水素カリウム等を含む培地を使用し、培養スケールが200L培養槽であり、培養温度が $23 \pm 1^\circ\text{C}$ であり、攪拌所要動力が 0.12 kW/m^3 である条件下で培養を実施した、浸透圧と生育の関係を示すグラフである。グラフ中の各記号「黒丸」、「黒四角」、及び「黒三角」は、それぞれ、浸透圧が 0.98 MPa 、 0.5 MPa 、及び 0.05 MPa の場合の結果である。

図3は、デンプン、グルコース、及びリン酸二水素カリウム等を含む培地を使用し、培養スケールが500mLフラスコ振盪培養であり、培養温度が $23 \pm 1^\circ\text{C}$ であり、攪拌所要動力が 0.14 kW/m^3 である条件下で培養を実施した、初発菌糸体濃度と生育の関係を示すグラフである。グラフ中の各記号「黒丸」、「黒四角」、「黒三角」、及び「×」は、それぞれ、初発菌糸体濃度が 0.06 g/L 、 0.2 g/L 、 0.6 g/L 、及び 1 g/L の場合の結果である。

図4は、ファイバー状菌糸体の菌糸体形状を示す図面である。

図5は、ペレット状菌糸体の菌糸体形状を示す図面である。

図6は、デンプン、グルコース、及びリン酸二水素カリウム等を含む培地を使用し、培養スケールが200L培養槽（培養液量=140L）であり、培養温度が $23 \pm 1^\circ\text{C}$ であり、攪拌所要動力が 0.12 kW/m^3 である条件下で培養を実施した、母菌形状と生育の関係を示すグラフである。グラフ中の各記号「黒丸」及び「黒四角」は、それぞれ、母菌形状がファイバー状及びペレット状の場合の結果である。

図7は、母菌培養系の概要を示す説明図である。

図8は、本発明方法を実施するのに用いることができる培養システムを示す説明図である。

図9は、デンプン、グルコース、及びリン酸二水素カリウム等を含む培地を使用し、培養スケールが 65 m^3 培養槽（培養液量=40 m^3 ）であり、培養温度が $23 \pm 1^\circ\text{C}$ であり、攪拌所要動力が $0.01 \sim 0.12 \text{ kW/m}^3$ である条件下で培養

を実施した、培養日数と菌糸体濃度の関係を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の製造方法では、非通気攪拌培養工程を少なくとも実施することにより、マツタケ菌糸体を製造することができる。本明細書において、非通気攪拌培養とは、液相（すなわち、培養液）への通気を行わないか、あるいは、液相への通気量が0.05 vvm以下であって培養液中に実質的に通気を行わない攪拌培養を意味する。なお、培養装置の内圧を保持する目的で、気相に通気を行うことは、非通気攪拌培養の範疇に入るものとする。非通気攪拌培養工程で得られるマツタケ菌糸体それ自体を、最終製品とすることもできるし、あるいは、大量製造の母菌として用いることもできるが、大量製造の母菌として用いることが特に好ましい。

本発明の製造方法における非通気攪拌培養工程に用いるマツタケ菌糸体としては、例えば、増殖及び馴化等を目的とする適当な前培養を実施することにより得られるマツタケ菌糸体を用いることができ、前記前培養としては、例えば、静置液体培養若しくは振盪培養、又はそれらの組み合わせ（特には、静置液体培養及び振盪培養の連続実施）を挙げることができる。

以下、静置液体培養、振盪培養、非通気攪拌培養、及び深部培養の順に、本発明の製造方法を説明する。

本明細書におけるマツタケ菌とは、トリコロマ (*Tricholoma*) 属、及びその近縁種に属する種の菌類を言う。例を挙げると、トリコロマ属としては、例えば、マツタケ (*Tricholoma matsutake*) があり、その近縁種には、例えば、ニセマツタケ (*Tricholoma fulvocastaneum* Hongo sp. nov.)、パカマツタケ (*T. bakamatsutake* Hongo sp. nov.)、又はマツタケモドキなどがある。

本発明の製造方法で使用するマツタケ菌、例えば、マツタケ菌の種株又はマツタケ菌の菌株であるマツタケ菌 I は、天然又は市販のマツタケ子実体から純粋分離した菌糸体を用いることができる。

更に、市販、あるいは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターなどに寄託されているマツタケ菌株も本発明において使用することができる。本発

明で用いることのできる菌株の例を挙げると、ATCC (American Type Culture Collection) のATCC34979株、ATCC34981株、若しくはATCC34988株、発酵研のIFO6915株、IFO6925株、IFO6930株、IFO6935株、IFO30604株、IFO30605株、若しくはIFO30606株、農生資源研のMAFF460038株、又は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されているトリコロマ属のFERM BP-7304株などがある。

マツタケ菌IIの培養又は保存に用いる培地は、一般的にマツタケ菌を培養する栄養源基質を有する培地であれば、特に制限無く使用することができる。例えば、太田培地 [Ohta, A (1990) Trans. Mycol. Soc. Japan 31: 323-334]、MMN培地 [Marx, D. H. (1969) Phytopathology 59: 153-163]、又は浜田培地 [浜田 (1964) マツタケ、97-100]などを挙げることができる。

固形培地用の固形化剤の例を挙げると、カラギーナン、マンナン、ペクチン、寒天、カードラン、デンプン、又はアルギン酸などがあり、これらのうち寒天が好ましい。

使用可能な培地の栄養源基質には、例えば、炭素源、窒素源、及び無機元素源などがある。

炭素源の例を挙げると、デンプン類（例えば、米デンプン、小麦粉デンプン、バレイショデンプン、又はサツマイモデンプンなど）、多糖類（例えば、デキストリン、又はアミロペクチンなど）、少糖類（例えば、マルトース、又はシュクロースなど）、又は単糖類（例えば、フラクトース、又はグルコースなど）がある。更に、麦芽エキスを挙げることができる。マツタケ菌の生長速度から、グルコースなどの単糖類が好ましい時期と、デンプン類の好ましい時期とがあるので、時期に応じた炭素源を選択し、必要に応じて組み合わせて使用する。

窒素源の例を挙げると、天然由来物質である酵母エキス、乾燥酵母、コーンステイプリカー、大豆粉、又は大豆ペプトンなどがあり、その他の窒素源としては、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、又は尿素などもある。これらを単独で、又は組み合わせて使用することができる。一般に、生長速度を考慮すると天然由来物

質、特に酵母エキ스가好ましい。

無機元素源は、リン酸及び微量元素を供給するために使用する。例を挙げると、リン酸塩、金属イオン（例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、マンガン、銅、又は鉄等）の硫酸塩、塩酸塩、硝酸塩、又はリン酸塩などの無機塩があり、必要量を培地中に溶解する。

更に、培地にビタミン類（例えば、ビタミンB 1 など）又はアミノ酸類を添加することもできる。

更に、使用するマツタケ菌の性質に応じて、植物抽出物、有機酸、又は核酸関連物質などを加えることができる。例を挙げると、果菜類、根菜類、又は葉菜類などの抽出物、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、フマル酸、又は乳酸などの有機酸、及び市販の核酸、核酸抽出物、酵母、又は酵母エキスなどの核酸関連物質がある。

固体培地を調製する場合、炭素源の使用量は、好ましくは10～100 g/L、より好ましくは10～50 g/L、特に好ましくは20～30 g/Lである。

窒素源の使用量は、窒素元素相当量で、好ましくは0.005～0.1 mol/L、より好ましくは、0.007～0.07 mol/L、特に好ましくは、0.01～0.05 mol/Lである。

リン酸塩の使用量は、リン元素相当量で、好ましくは0.001～0.05 mol/L、より好ましくは、0.005～0.03 mol/L、特に好ましくは、0.01～0.02 mol/Lになるように使用する。更に、他の無機塩、ビタミン類、植物抽出物、有機酸、及び／又は核酸関連物質などマツタケ菌の性質に応じて適宜添加することができる。また、調製した栄養源基質溶液のpHを好ましくは4～7、より好ましくは4.5～6.0、特に好ましくは5.0～5.5とする。

（静置液体培養）

次に、マツタケ菌II（固形培地又は液体培地で、培養又は保存したマツタケ菌）を静置液体培養してマツタケ菌IIIを製造する方法について記載する。

通常、静置液体培養可能な培養容器（例えば、30 mL～10 L容、好ましくは100 mL～2 L容の三角フラスコ）を用いて行う。

この静置液体培養は、液体培地にマツタケ菌IIを接種することにより開始する。

接種したマツタケ菌IIを含有する培養液と液体培地とを合わせた体積の、接種し

たマツタケ菌IIを含有する培養液の体積に対する比（以下において、「接種時拡大倍率」と記載）が好ましくは2～50倍、より好ましくは3～30倍となる量の液体培地を使用する。

接種したマツタケ菌IIを含有する培養液中のマツタケ菌IIの乾燥菌糸体重量と、接種したマツタケ菌IIを含有する培養液と液体培地とを合わせた混合物の体積の比（以下において、「初発菌糸体濃度」と記載）を、好ましくは0.05～3 g/L、より好ましくは0.1～2 g/Lとなるように、液体培地にマツタケ菌IIを含有する培養液を接種する。

本発明の静置液体培養では、培養温度を、好ましくは15～30℃、より好ましくは20～25℃とし、好ましくは30～400日間、より好ましくは120～240日間培養する。培養期間が、30日未満であっても、400日間より長期間であっても、大量培養に適した生育能を有するマツタケ菌IIIを得ることが困難になる。

静置液体培養に使用する液体培地は、その浸透圧を好ましくは0.01～0.8 MPa、より好ましくは0.02～0.7 MPa、特に好ましくは0.03～0.5 MPaとなるように、栄養源基質を使用する。

静置液体培養に用いる栄養源基質として、マツタケ菌Iを培養する固形培地と同じ炭素源、窒素源、無機元素源、ビタミン類（例えば、ビタミンB1など）、又はアミノ酸類を使用することができる。

炭素源の使用量は、好ましくは10～100 g/L、より好ましくは20～60 g/L、特に好ましくは25～45 g/Lである。通常、グルコース等の単糖類を使用する。

窒素源の使用量は、窒素元素相当量で、好ましくは0.005～0.1 mol/L、より好ましくは、0.007～0.07 mol/L、特に好ましくは、0.01～0.05 mol/Lである。

リン酸塩を使用する場合は、リン元素相当量で好ましくは0.001～0.05 mol/L、より好ましくは、0.005～0.03 mol/L、特に好ましくは、0.01～0.02 mol/Lになるようにする。

更に、他の無機塩、ビタミン類、植物抽出物、有機酸、及び核酸関連物質などマツタケ菌の性質に応じて適宜添加することができる。

調製した栄養源基質溶液のpHを好ましくは4～7、より好ましくは4.5～6.5、特に好ましくは5.0～6.0とする。

マツタケ菌IIIを含有している静置液体培養による培養液の一部又は全部を、マツタケ菌IIを含有している培養液（若しくは、培養物）と同様に静置液体培養の接種源として、再度、静置液体培養工程で使用することもできる。

（振盪培養）

次に、マツタケ菌IIIを振盪培養して、マツタケ菌IVを製造する方法について記載する。

通常、振盪培養可能な培養容器（例えば、30mL～10L容、好ましくは300mL～5L容の三角フラスコ又は坂口フラスコ）を用いて行う。

この振盪培養は、液体培地にマツタケ菌III（すなわち、静置液体培養により得られるマツタケ菌）を接種することにより開始することもできるし、あるいは、マツタケ菌II（すなわち、固形培地又は液体培地で培養又は保存したマツタケ菌）を接種することにより開始することもできる。前記接種は、前段階で得られたマツタケ菌系体をホモジェネート処理してから用いることが好ましい。

接種したマツタケ菌IIIを含有する培養液と液体培地とを合わせた体積の、接種したマツタケ菌IIIを含有する培養液の体積に対する比（以下において、「接種時拡大倍率」と記載）が好ましくは2～50倍、より好ましくは3～30倍、特に好ましくは5～10倍となる量の液体培地を使用する。

なお、接種時拡大倍率に見合う培養液の量を確保するために、静置液体培養を複数の培養容器を用いて製造することもできる。

接種したマツタケ菌IIIを含有する培養液中のマツタケ菌IIIの乾燥菌系体重量と、接種したマツタケ菌IIIを含有する培養液と液体培地とを合わせた混合物の体積の比（以下において、「初発菌系体濃度」と記載）を、好ましくは0.05～3g/L、より好ましくは0.1～2g/Lとなるように、液体培地にマツタケ菌IIIを含有する培養液を接種する。

振盪培養では、培養温度を、好ましくは15～30℃、より好ましくは20～25℃とし、好ましくは5～50日間、より好ましくは7～50日間、より好ましくは14～28日間実施し、攪拌培養に用いるマツタケ菌IVを製造する。

振盪培養に要する動力として、通常、三角フラスコ内の培養液単位体積あたりの攪拌所要動力 $0.01 \sim 2 \text{ kW/m}^3$ 、好ましくは $0.05 \sim 0.4 \text{ kW/m}^3$ を用いる。

振盪培養に使用する液体培地は、その浸透圧を好ましくは $0.01 \sim 0.8 \text{ MPa}$ 、より好ましくは $0.02 \sim 0.7 \text{ MPa}$ 、特に好ましくは、 $0.03 \sim 0.5 \text{ MPa}$ となるように、栄養源基質を使用する。

振盪培養に用いられる栄養源基質として、マツタケ菌IIを培養する液体培地と同じ炭素源、窒素源、無機元素源、ビタミン類（例えば、ビタミンB1など）、又はアミノ酸類を使用することができる。

炭素源の使用量は、好ましくは $10 \sim 100 \text{ g/L}$ 、より好ましくは $20 \sim 60 \text{ g/L}$ 、特に好ましくは $25 \sim 45 \text{ g/L}$ である。通常、グルコース等の単糖類を使用する。

窒素源の使用量は、窒素元素相当量で、好ましくは $0.005 \sim 0.1 \text{ mol/L}$ 、より好ましくは、 $0.007 \sim 0.07 \text{ mol/L}$ 、特に好ましくは、 $0.01 \sim 0.05 \text{ mol/L}$ である。

リン酸塩の使用量は、リン元素相当量で好ましくは $0.001 \sim 0.05 \text{ mol/L}$ 、より好ましくは、 $0.005 \sim 0.03 \text{ mol/L}$ 、特に好ましくは、 $0.01 \sim 0.02 \text{ mol/L}$ になるようにする。

更に、他の無機塩、ビタミン類、アミノ酸類、植物抽出物、有機酸、及び／又は核酸関連物質などマツタケ菌の性質に応じて適宜添加することができる。

調製した栄養源基質溶液のpHを好ましくは $4 \sim 7$ 、より好ましくは $4.5 \sim 6.5$ 、特に好ましくは $5.0 \sim 6.0$ とする。

（非通気攪拌培養）

次に、非通気攪拌培養により、マツタケ菌Vを製造する方法について記載する。

この攪拌培養は、液体培地にマツタケ菌IV（すなわち、振盪培養工程により得られるマツタケ菌）又はマツタケ菌III（すなわち、静置液体培養により得られるマツタケ菌）を接種することにより開始する。前記接種は、前段階で得られたマツタケ菌系体をホモジェネート処理してから用いることができる。

以下、マツタケ菌IVを接種する場合を例に取り、非通気攪拌培養工程を説明する

が、マツタケ菌IIIを用いても同様にして実施することができる。また、攪拌培養で得られるマツタケ菌を、再度、攪拌培養に用いることもできる。

非通気攪拌培養で用いる液体培地は、次のようにして調製することができる。

栄養源基質は、振盪培養で使用する、炭素源、窒素源、無機元素源、ビタミン類（例えば、ビタミンB1など）、又はアミノ酸類と同じものを使用することができる。

炭素源の使用量は、好ましくは10～100 g/L、より好ましくは20～60 g/Lであり、特に好ましくは25～45 g/Lである。デンプン類を好ましく使用できる。

非通気攪拌を行なう培養液中の浸透圧に影響するグルコースなどの単糖類を併用する場合、その使用量は、好ましくは0.1～60 g/L、より好ましくは0.5～40 g/L、特に好ましくは0.7～20 g/Lである。

窒素源の使用量は、窒素元素相当量で、好ましくは0.005～0.1 mol/L、より好ましくは0.007～0.07 mol/L、特に好ましくは0.01～0.05 mol/Lである。

リン酸塩の使用量は、リン元素相当量で好ましくは0.001～0.05 mol/L、より好ましくは0.005～0.03 mol/L、特に好ましくは0.01～0.02 mol/Lになるようにする。

更に、他の無機塩、ビタミン類、アミノ酸類、植物抽出物、有機酸、及び／又は核酸関連物質などマツタケ菌の性質に応じて、適宜、添加することができる。

調製した栄養源基質溶液のpHを好ましくは4～7、より好ましくは4.5～6.5、特に好ましくは5.0～6.0とする。

非通気攪拌培養に使用する液体培地は、その浸透圧を好ましくは0.01～0.8 MPa、より好ましくは0.02～0.7 MPa、特に好ましくは0.03～0.5 MPaとなるように、栄養源基質を使用する。

非通気攪拌培養の培養温度は、好ましくは15～30℃、より好ましくは20～25℃である。

接種したマツタケ菌（IV）を含有する培養液と液体培地とを合わせた体積の、接種したマツタケ菌（IV）を含有する培養液の体積に対する比（以下において、「接

種時拡大倍率」と記載)が好ましくは2~50倍、より好ましくは3~30倍、特に好ましくは5~10倍となる量の液体培地を使用する。

接種したマツタケ菌(IV)を含有する培養液中のマツタケ菌(IV)の乾燥菌糸体重量と、接種したマツタケ菌(IV)を含有する培養液と液体培地とを合わせた混合物の体積の比(以下において、「初発菌糸体濃度」と記載)を、好ましくは0.01~5g/L、より好ましくは0.05~3g/L、特に好ましくは0.1~2g/Lとなるように、液体培地にマツタケ菌(IV)を含有する培養液を接種する。なお、初発菌糸体の内、0.005~5g/L、好ましくは0.025~3g/L、特に好ましくは0.05~2g/Lがファイバー状菌糸体であることが望ましい。

非通気攪拌培養で得られるマツタケ菌(V)を、次の深部培養の母菌として用いる場合の培養日数は、好ましくは3~20日間、より好ましくは5~14日間実施する。

これらの培養日数後に、マツタケ菌(V)の乾燥菌糸体含有量が、好ましくは0.5~10g/L、より好ましくは1~8g/L、特に好ましくは1~6g/Lになっている培養液は、深部培養に適した生育能を有するマツタケ菌(V)を含有している。

非通気攪拌培養で得られるマツタケ菌(V)を、マツタケ菌糸体として分離する場合の培養日数は、好ましくは5~30日間、より好ましくは7~20日間、特に好ましくは10~15日間実施する。

これらの培養日数から、炭素源の資化速度が著しく低下した時を培養終了とするのが好ましいが、適宜、製造サイクル又は製造コスト等の製造形態に合わせて決定することができる。

振盪培養及びそれ以降の工程では、マツタケ菌糸体は、大別して、ペレット状とファイバー状の形状をとる。本発明の製造方法では、各工程で得られた菌糸体を次の工程の母菌として使用する場合には、その菌糸体の50%以上(より好ましくは80%以上)がファイバー状であることが好ましい。ファイバー状の菌糸体は、次の液体培地に接種した場合、ペレット状菌糸体と比べ、速やかな増殖を得ることができる。なお、菌糸体全体の量が充分確保することができる場合には、ファイバー状菌糸体が前記割合よりも低くても、ファイバー状菌糸体の絶対量を十分に確保す

ることができるため、前記割合に限定されるものではない。なお、ファイバー状菌糸体とペレット状菌糸体の比率は、例えば、目開き 1 mm 程度のメッシュ等で水篩することにより測定することができる。

一方、その工程が最後の工程となり、最終製品としてのマツタケ菌糸体を分離する場合には、マツタケ菌糸体の量を十分に確保することが重要であるので、ペレット状又はファイバー状のいずれの形状であるかは重要でなく、ペレット状とファイバー状との割合も特に限定されるものではない。

非通気攪拌培養は、小スケール培養、すなわち、小スケールの培養液を用いて実施する。非通気攪拌培養で用いることのできる培養液量は、通常の微生物の大量培養における一般的な段階的培養において実施される小スケール培養の範囲を超えない限り、特に限定されるものではない。非通気攪拌培養で用いることのできる培養液量は、通常、1000 L 未満であり、好ましくは500 L 未満、より好ましくは100 L 未満である。また、培養液量の下限は、通常、0.8 L 以上であり、好ましくは4 L 以上である。

非通気攪拌培養に使用する培養装置としては、例えば、無菌性を確保することができ、小スケール培養が可能な培養装置を用いることができる。このような培養装置としては、小型培養装置、例えば、容積が1000 L 以下（好ましくは500 L 以下、より好ましくは100 L 以下、特に好ましくは100 L 未満）の小型培養装置（例えば、ジャーファーマンター又は小型培養槽）を使用することができる。なお、前記培養装置の容量の下限は、通常、1 L 以上であり、好ましくは5 L 以上である。

マツタケ菌Ⅳの培養を行いマツタケ菌Ⅴを製造する場合、液体培地中に通気せずに、攪拌培養を行なう。小スケール培養（例えば、100 L 未満のジャーファーマンター又は小型培養槽）で通気を行なって培養すると、菌糸が凝集し、成長点が欠失して母菌としての生育能が損なわれる場合があるからである。

非通気攪拌培養における攪拌は、培養初期では培養液単位体積あたりの攪拌所要動力で制御する。通常、0.01～2 kW/m³、好ましくは0.05～1 kW/m³の範囲で攪拌を行なうことにより、マツタケ菌糸体が良好に生育する。培養初期を過ぎれば菌が生育をはじめ、酸素供給量が不足し、更に、生育した菌糸体の分

散が不十分になるので、適宜、攪拌の強度を大きくすることが必要になる。

非通気攪拌培養から得られたマツタケ菌系体の分離及び回収は、常法によって行うことができる。例えば、フィルタープレスなどによるろ過、又は遠心分離などである。得られたマツタケ菌系体は、その使用目的に応じて、乾燥し、又は乾燥しないで、破碎、抽出又は成形して製品化する。

(深部培養)

深部培養では、マツタケ菌Ⅴ、すなわち、非通気攪拌培養で得られるマツタケ菌を、液体培地に接種することにより開始することができる。また、深部培養で得られるマツタケ菌（例えば、マツタケ菌Ⅴ～ⅦⅠ）を、再度、深部培養に用いることもできる。更には、マツタケ菌Ⅳ、すなわち、振盪培養工程により得られるマツタケ菌（特には、静置液体培養し、続いて、振盪培養することにより得られるマツタケ菌）を、深部培養に用いることもできる。前記接種は、前段階で得られたマツタケ菌系体をホモジェネート処理してから用いることができる。

また、深部培養とは、空気を培養槽外から培養液中に強制的に供給し、攪拌装置による機械的攪拌、あるいは、ドラフトチューブ又は分散板等によって通気される気泡を微粒化し、気液界面を大きくさせ、しかも、培養液中の気泡の滞留時間を大きくさせることにより、微生物への酸素供給を効率よく行う方法である。例えば、通気攪拌培養槽による培養、気泡塔型培養槽（エアリフト型培養槽）による培養、又は流動層型培養槽による培養などを挙げることができる。

深部培養で用いる液体培地は、非通気攪拌培養で用いる液体培地と同じものを使用することができる。また、非通気攪拌培養と同じ基質を用いることができ、目標収量に合わせて基質濃度を調整することができる。但し、基質由来の浸透圧を0.01～0.8MPaに調整することが望ましい。

また、培養温度、接種時拡大倍率、初発菌系体濃度、培養日数、及び攪拌所要動力についても、非通気攪拌培養と同様にして実施することができる。

深部培養は、大スケール培養、すなわち、大スケールの培養液を用いて実施することが好ましい。深部培養で用いることのできる培養液量は、通常の微生物の大量培養における一般的な段階的培養において実施される大スケール培養の範囲を超えない限り、特に限定されるものではない。深部培養で用いることのできる培養液量

は、通常、100L以上であり、好ましくは1000L以上、より好ましくは3000L以上である。

深部培養に使用する培養装置としては、必要に応じて通気することができ、深部攪拌ができ、無菌性を確保することができ、大スケール培養が可能な培養装置を用いることができる。このような培養装置としては、大型培養装置、例えば、容積が100L以上、好ましくは1000L以上、より好ましくは3000L以上の大型培養装置を用いることができる。なお、前記大型培養装置には、中型培養装置と称されることのある培養装置も含まれる。

大スケール培養（例えば、100L以上の大型培養槽などの培養装置）により工業スケールで深部培養を行なう場合、必要に応じて通気を行なう。この場合の通気量は、0.05～1.0vvm、特に、0.2～0.5vvmとするのが好ましい。

深部培養における攪拌は、培養初期では培養液単位体積あたりの攪拌所要動力で制御する。通常、0.01～2kW/m³、好ましくは0.05～1kW/m³の範囲で攪拌を行なうことにより、マツタケ菌糸体が良好に生育する。培養初期を過ぎれば菌が生育をはじめ、酸素供給量が不足し、更に、生育した菌糸体の分散が不十分になるので、適宜、攪拌の強度を大きくすることが必要になる。深部培養では、培養初期には低通気及び低攪拌速度で培養し、培養後期には高通気及び高攪拌速度で培養するのが好ましい。

深部培養から得られたマツタケ菌糸体の分離及び回収は、常法によって行なうことができる。例えば、フィルタープレスなどによるろ過、又は遠心分離などである。得られたマツタケ菌糸体は、その使用目的に応じて、乾燥し、又は乾燥しないで、破碎、抽出又は成形して製品化する。

以下、マツタケ菌糸体としてマツタケFERM BP-7304株を用いた場合を例に挙り、本発明方法について、更に説明する。なお、以下の説明は、FERM BP-7304株以外のマツタケ株についても、通常、当てはまる。

1. 生育特性

FERM BP-7304株は環境要因に敏感である。物理的な環境要因は、攪拌由来の機械的衝撃及び浸透圧などが考えられる。また、生育に時間を要するため、短期間で培養を終了するためには、各継代時に多量の母菌を必要とし、大量接種が

可能な培養システムの構築が必要である。

2. 基本培養条件

(1) 機械的衝撃への耐性

通気攪拌培養での攪拌の主な目的は、酸素及び栄養源の拡散である。FERM BP-7304株の増殖速度は遅く、酸素要求量は小さく、過剰な酸素供給は不要と考える。図1は攪拌所要動力と生育の関係を示したグラフである。攪拌所要動力が大きい場合、菌糸体の生育が阻害される。また、溶存酸素の低下が見られないことから、攪拌の影響は機械的衝撃が支配的と考えられる。

更に、攪拌所要動力の大きな系では、菌糸体形状がペレット化する傾向があり、生育が停滞する。この原因は、攪拌による凝集効果に起因すると考えられる。本菌株の生育において、菌糸体への機械的ダメージ及びペレット化が重要な要因となっている。

(2) 生育と浸透圧

通常、担子菌の炭素源資化経路は、糖類をグルコースに分解し、グルコース-6-リン酸に変換した後に細胞内に取り込むと考えられる。つまり、一般には多糖類に比してグルコースなどの単糖類の資化効率が高いといえる。FERM BP-7304株においても同様にグルコースを経て多糖類を資化することが推測されるが、グルコース濃度の高い高浸透圧の培養液中では、生育が阻害される傾向がある。図2は培地中の炭素源にデンプン及びグルコースを混合し、浸透圧を調整し、培養を行った実験結果である。グルコース濃度の高い系では、生育が得られにくい傾向があり、浸透圧に対する耐性が小さいことが示唆される。そこで、デンプンを主炭素源とした培地にグルコースを微量添加することで、2つの炭素源の特性を活用する培地処方を採用することができる。

(3) 必要母菌量

マツタケ菌は生育が遅いことが知られているが、FERM BP-7304株も同様、生育速度は遅い傾向をもつが、工業的な生産培養を実施する上では、一定期間内に有効な生育を得ることが望ましい。図3はFERM BP-7304株の母菌接種量と生育速度の関係を検討した結果を示す。初発菌糸体濃度0.1~2.0 g/L程度（その内、ファイバー状菌糸体が0.05~2.0 g/L）の条件の生

育が早く、工業的な培養においては多量の接種量が必要であることが示唆される。特に低接種量の場合、誘導期間が著しく長く工業的な培養が困難となる傾向がある。

(4) 菌糸体形状の制御

糸状菌の培養において、菌糸体の形状は生育に大きな影響を与えることが知られている。FERM BP-7304株は大別して、ファイバー状(図4)とペレット状(図5)の形状をとるが、ファイバー状の菌糸体が生育が有利である。図6はペレット状の母菌とファイバー状の母菌を接種し、生育を確認した生育曲線であるが、ペレット状の母菌を接種した系では有効な生育が得られない傾向がある。そのため、菌糸体形状の制御は工業生産において重要な要件となる。FERM BP-7304株の菌糸体形状に寄与する要因として、例えば、培養液の流動、母菌接種量、培地処方等が挙げられる。特に、小型のジャーファーマンターにおいては通気による培養液の流動により菌糸体が相互に絡み合い、融着してペレットを形成する傾向があり、良好な前培養母菌を得るためには、通気方法を最適化することが好ましい。ペレット状菌糸体は母菌として効率的生育を示さないため、工業的な培養を行う上では、母菌中に含まれるファイバー状菌糸体の母菌全体の比率で50%以上、特に80%とすることが好ましい。但し、次世代での初発菌糸体(乾燥重量換算)の内、ファイバー状菌糸体濃度が0.05~2g/L程度確保することができれば、これに代えることができる場合がある。

3. 培養システム

(1) 母菌培養系

前述のように、FERM BP-7304株は大量の母菌を必要とする傾向があるため、大量の母菌を培養するシステムを用いることが好ましい。そこで、図7に示すように、固形培地で継代保存した母菌を多段階に静置培養した後、振盪培養を行って菌量培養法を確立した。この培養方法は液体培地への馴化を目的としている。

(2) タンク培養系

FERM BP-7304株の生育を速やかに得るためには、大量の母菌を必要とする傾向があることは前述のとおりである。従って、タンク培養においても同様であり、初発菌糸体濃度0.1~2.0g/L程度であることが好ましい。また、培養開始時の培養液中の菌糸体は、初発菌糸体濃度として0.05~2.0g/L

程度のファイバー状菌糸体が含まれていることが好ましい。図8は、本発明方法を実施するのに用いることができる培養システムである。タンク培養系は本培養を含め、4段階としており、いずれも0.1~2.0 g/L程度の初発菌糸体濃度を確保するため、拡大倍率を5~15倍程度に設定している。図8に示す培養システムと培養法により、本培養12~14日間で、12~14 g/L程度の菌糸体収量確保が可能となった。図9に生産培養の生育曲線の一例を示す。

実施例

以下に本発明に係わる、マツタケ菌糸体の大量製造の母菌として利用可能なマツタケ菌糸体を製造し、これを利用して、マツタケ菌糸体を大量に製造する方法を実施例で説明する。

実施例において、使用したマツタケ菌は、マツタケFERM BP-7304株である。マツタケFERM BP-7304株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター〔(旧)工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)〕に平成12年9月14日より寄託しているものである。FERM BP-7304の菌学的性質については、国際公開第WO02/30440号パンフレット(特許文献1)に記載されている。例えば、10mLのエピオス寒天斜面培地を入れた試験管中で維持されている。

先述のマツタケ菌II~マツタケ菌VIIIに対応する、マツタケFERM BP-7304を使用して得られたマツタケ菌を、マツタケ菌(II-1)~マツタケ菌(VIII-1)と記載した。

攪拌培養に以下の装置を使用した。

実施例3、比較例2-1、又は比較例3-1(非通気の場合)において、6枚ディスクタービン翼2段を備えた攪拌機と通気用スパージャーを装備した30L容のジャーファーマンターから通気用スパージャーを取り外して使用した。実施例又は比較例、各々において、30L容ジャーファーマンターと記載した。

比較例3-1において、6枚ディスクタービン翼2段を備えた攪拌機と通気用スパージャーを装備した30L容のジャーファーマンターを使用した。比較例3-1

において、スパージャー装備 30 L 容ジャーフェーマンターと記載した。

実施例 4、実施例 7-1~7-4、実施例 8-2、8-3、実施例 9-1~9-3、又は実施例 11-1 において、4 枚ディスクタービン翼 2 段を備えた攪拌機と通気用スパージャーを装備した 200 L 容培養槽を使用した。実施例、各々において、200 L 容培養槽と記載した。

実施例 5 において、6 枚ディスクタービン翼 2 段を備えた攪拌機と通気用スパージャーを装備した 7 m³ 容培養槽を使用した。実施例 5 において、7 m³ 容培養槽と記載した。

実施例 6 において、6 枚ディスクタービン翼 3 段を備えた攪拌機と通気用スパージャーを装備した 65 m³ 容培養槽を使用した。実施例 6 において、65 m³ 容培養槽と記載した。

実施例 2~6、実施例 7-1、実施例 9-1、実施例 10-1~10-3、又は実施例 11-1 に「培養液単位体積当たりの攪拌所要動力」と記載されている中の培養液は、各々で使用されている、2 L 容三角フラスコ、30 L 容ジャーフェーマンター、スパージャー装備 30 L 容ジャーフェーマンター、200 L 容培養槽、7 m³ 容培養槽、又は 65 m³ 容培養槽の中の全内容物（接種母菌の培養液も含む）を意味しており、調合した液体培地のみを意味しているのではない。

栄養源基質として、実施例 4、実施例 7-1、実施例 9-1、又は実施例 11-1 において、200 L 容培養槽を用いて、培地を調製する際に、次の 3 通りの組み合わせのいずれかを記載する必要がある場合には、A 型基質、B 型基質、又は C 型基質と記載した。

A 型基質：（1）バレイショデンプン 4.9 kg、（2）グルコース 140 g、（3）乾燥酵母エキス 280 g、（4）リン酸二水素カリウム 280 g、（5）硫酸マグネシウム・7 水和物 42 g、（6）塩化カルシウム・2 水和物 0.84 g、（7）硫酸亜鉛・7 水和物 0.56 g、（8）塩化マンガン・4 水和物 0.70 g、（9）硫酸銅・5 水和物 0.14 g、（10）塩化鉄・6 水和物 1.12 g、及び（11）チアミン塩酸塩 0.14 g。

B 型基質：A 型基質と、（3）乾燥酵母エキス 320 g のみ異なっている。他〔（1）、（2）、及び（4）~（11）〕は内容及び使用量ともに A 型基質と同

じ。

C型基質：A型基質及びB型基質と、(4)～(11)の内容と使用量が同じで、乾燥酵母エキスを640gと、バレイショデンプンとグルコースの使用量が異なっている。バレイショデンプンとグルコースの使用量は実施例11-1～11-3に記載の量を使用した。

以下の実施例1～実施例6で、500mL容三角フラスコから65m³容培養槽まで製造規模を拡大して行く過程を示した。

実施例1：500mL容三角フラスコを用いた、静置液体培養によるマツタケ菌(III-1)の製造方法

グルコース30g/L及び乾燥酵母エキスを3g/Lとなるように水道水に溶解し培地を調製した。接種後の培地の浸透圧は、0.4MPaであった。この培地を500mL容の三角フラスコに120mL分注し、滅菌した。上記培地組成に静置液体培養で継代保存していたマツタケ菌(II-1)を含有する培養液10mLを接種し、23±2℃の条件下で180日間静置液体培養し、マツタケ菌(III-1)乾燥菌糸体含有量5g/Lの培養液を製造した。

接種時拡大倍率13倍、初発菌糸体濃度0.38g/L。

実施例2：振盪培養によるマツタケ菌(IV-1)の製造方法

グルコース30g/L、乾燥酵母エキスを1g/L、大豆ペプトン2g/L、麦芽エキスを1g/L、リン酸二水素カリウム1g/L、リン酸水素二カリウム1g/L、及び硫酸マグネシウム・7水和物を0.3g/Lとなるように水道水に溶解し、培地を調製した。この培地を2L容の三角フラスコに870mL分注し、滅菌した。この870mLの培地に、実施例1のようにして製造した、マツタケ菌(III-1)乾燥菌糸体含有量5g/Lの培養液130mLをホモジェネート処理後に接種し、ロータリーシェイカーで培養液単位体積当たりの攪拌所要動力0.14kw/m³、23±2℃の条件下で20日間振盪培養し、マツタケ菌(IV-1)乾燥菌糸体含有量5g/L（その内、ファイバー状菌糸体4.8g/L）を含有する培養液を製造した。接種後の浸透圧は、0.4MPaであった。

接種時拡大倍率7.7倍、初発菌糸体濃度0.65g/L。

実施例3：30L容ジャーフェーマンターによるマツタケ菌(V-1)の製造方法

バレイショデンプン600 g、グルコース60 g、乾燥酵母エキス40 g、リン酸二水素カリウム40 g、硫酸マグネシウム・7水和物6 g、塩化カルシウム・2水和物0.12 g、硫酸亜鉛・7水和物0.08 g、塩化マンガン・4水和物0.1 g、硫酸銅・5水和物0.02 g、塩化鉄・6水和物0.18 g、及びチアミン塩酸塩0.02 gを30 L容ジャーフェーマンター内で水道水に溶解し、滅菌し、18 Lの培地を調製した。接種後の培地の浸透圧は、0.05 MPaであった。

この培地に、実施例2のようにして製造した、マツタケ菌（IV-1）乾燥菌糸体含有量5 g/Lを含有する培養液2 Lを接種し、培養液単位体積当たりの攪拌所要動力0.08 kW/m³、23±2℃の条件下で、培養液中に通気用スパージャーから通気することなしに、7日間培養し、マツタケ菌（V-1）乾燥菌糸体含有量1 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.95 g/L）の培養液を製造した。接種時拡大倍率10倍、初発菌糸体濃度0.5 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.45 g/L）。

実施例4：200 L容培養槽によるマツタケ菌（VI-1）の製造方法

A型基質を200 L容培養槽内で水道水に溶解し、滅菌して120 Lの培地を調製した。培地の浸透圧は、0.05 MPaであった。この培地に、実施例3のようにして製造した、マツタケ菌（V-1）乾燥菌糸体1 g/Lを含有する培養液20 Lを接種し、培養液単位体積当たりの攪拌所要動力0.12 kW/m³、通気量42 L/min、23±2℃の条件下で7日間深部培養し、マツタケ菌（VI-1）乾燥菌糸体含有量3 g/L（その内、ファイバー状菌糸体2.7 g/L）の培養液を製造した。

接種時拡大倍率7倍、初発菌糸体濃度0.14 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.13 g/L）。

実施例5：7 m³容培養槽によるマツタケ菌（VII-1）の製造方法

溶性デンプン140 kg、グルコース4 kg、乾燥酵母エキス8 kg、リン酸二水素カリウム8 kg、硫酸マグネシウム・7水和物1.2 kg、塩化カルシウム・2水和物24 g、硫酸亜鉛・7水和物16 g、塩化マンガン・4水和物20 g、硫酸銅・5水和物4 g、塩化鉄・6水和物32 g、及びチアミン塩酸塩4 gを7 m³容培養槽内で水道水に溶解し、滅菌し、培地3.72 m³を調製した。培地の浸透

圧は、 0.05 MPa であった。この培地に、実施例4のようにして製造した、マツタケ菌（VI-1）乾燥菌糸体含有量 3 g/L の培養液、2槽相当分である 280 L を接種し、培養液単位体積当たりの攪拌所要動力 0.05 kW/m^3 、通気量 $1.2 \text{ m}^3/\text{min}$ 、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ で、7日間深部培養し、マツタケ菌（VII-1）乾燥菌糸体含有量 3 g/L （その内、ファイバー状菌糸体 2.6 g/L ）の培養液を製造した。

接種時拡大倍率14.3倍、初発菌糸体濃度 0.21 g/L （その内、ファイバー状菌糸体 0.19 g/L ）。

実施例6：65m³容培養槽によるマツタケ菌（VIII-1）の製造方法

溶性デンプン 1575 kg 、グルコース 45 kg 、乾燥酵母エキス 135 kg 、リン酸二水素カリウム 90 kg 、硫酸マグネシウム・7水和物 13.5 kg 、塩化カルシウム・2水和物 270 g 、硫酸亜鉛・7水和物 180 g 、塩化マンガン・4水和物 225 g 、硫酸銅・5水和物 45 g 、塩化鉄・6水和物 360 g 、及びチアミン塩酸塩 45 g を 65 m^3 容培養槽内で水道水に溶解し、滅菌し、 36 m^3 の培地を調製した。接種後の浸透圧は、 0.05 MPa であった。

この培地に、実施例5のようにして製造した、マツタケ菌（VII-1）乾燥菌糸体含有量 3 g/L の培養液、1槽相当分である 4 m^3 を接種し、通気量 $1.2 \text{ m}^3/\text{min}$ 、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ で、培養液単位体積当たりの攪拌所要動力 0.013 kW/m^3 で培養を開始し、その後、菌糸の伸張をみて、適宜、培養液単位体積当たりの攪拌所要動力を大きくしていき、12日目に 0.12 kW/m^3 とし、13日間深部培養して、マツタケ菌（VIII-1）乾燥菌糸体含有量 13.5 g/L の培養液を製造した。

接種時拡大倍率10倍、初発菌糸体濃度 0.3 g/L （その内、ファイバー状菌糸体 0.26 g/L ）。

比較例1

静置液体培養によるマツタケ菌（II-1）を含有している培養液が振盪培養に及ぼした効果：静置液体培養の工程を経ない培養物と比較。

マツタケ菌（II-1）を含有しているエビオス寒天斜面培地培養物 10 mL を用いる他は、実施例2と同様に、20日間振盪培養した。

20日後の培養液から乾燥菌糸体含有量を求めることができなかった。

実施例 7

静置液体培養によるマツタケ菌（III-1）を含有している培養液の製造期間が200L容培養槽による深部培養に及ぼした効果：実施例1の180日間静置液体培養と、30日間静置液体培養、50日間静置液体培養及び、400日間静置液体培養で製造した培養液を用いて比較。

実施例 7-1：180日間静置液体培養

実施例1、実施例2、次いで、実施例3と同様にして、マツタケ菌（V-1）を含有している培養液を製造した。

他方、B型基質を200L容培養槽内で水道水に溶解し、滅菌して120Lの培地を調製した。この培地に、マツタケ菌（V-1）を含有している培養液20Lを接種し、培養液単位体積当たりの攪拌所要動力0.12kW/m³、通気量42L/min、23±2℃の条件下で、12日間深部培養した。

乾燥菌糸体含有量12g/Lの培養液が得られた。

接種時拡大倍率7倍、初発菌糸体濃度0.14g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.13g/L）。

実施例 7-2：30日間静置液体培養

静置液体培養の期間のみ30日間とする他は、実施例1と同様に培養した培養液を用いて、実施例2、次いで、実施例3と同様の培養操作を行い、培養液を製造した。この培養液20L用いる他は、200L容培養槽で実施例7-1に準じた培養操作を行った。

乾燥菌糸体含有量2g/Lの培養液が得られた。

実施例 7-3：50日間静置液体培養

静置液体培養の期間のみ50日間とする他は、実施例1と同様に培養した培養液を用いて、実施例2、次いで、実施例3と同様の培養操作を行い、培養液を製造した。この培養液を20L用いる他は、200L容培養槽で実施例7-1に準じた培養操作を行った。

乾燥菌糸体含有量8g/Lの培養液が得られた。

実施例 7-4：400日間静置液体培養

静置液体培養の期間のみ400日間とする他は、実施例1と同様に培養した培養液を用いて、実施例2、次いで、実施例3と同様の培養操作を行い、培養液を製造した。この培養液20Lを用いる他は、200L容培養槽で実施例7-1に準じた培養操作を行った。

乾燥菌糸体含有量6 g/Lの培養液が得られた。

比較例2

振盪培養によるマツタケ菌（IV-1）を含有している培養液が200L容培養槽による深部培養に及ぼした効果：振盪培養の工程を経ない培養液と比較

比較例2-1：振盪培養抜き

実施例1で製造した、マツタケ菌（III-1）乾燥菌糸体含有量5 g/Lの培養液2Lを用いて、菌糸体をホモジェネート処理後、実施例3と同様の培養操作で、30L容ジャーファーマンターで培養を行ったが、7日間培養後の培養液から乾燥菌糸体含有量を求めることができなかった。

なお、20日間振盪培養を実施した結果は、実施例7-1に示すとおりである。

接種時及び、培養後のデータは次の通り。

乾燥菌糸体含有量12 g/Lの培養液が得られた。

接種時拡大倍率7倍、初発菌糸体濃度0.14 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.13 g/L）。

実施例8

振盪培養によるマツタケ菌（IV-1）を含有している培養液が200L容培養槽による深部培養に及ぼした効果：実施例2の20日間振盪培養と、5日間振盪培養、3日間振盪培養とで得られた培養液を用いて比較。

実施例8-1：20日間振盪培養

実施例7-1に示すとおりである。

接種時及び、培養後のデータは次の通り。

乾燥菌糸体含有量12 g/Lの培養液が得られた。

接種時拡大倍率7倍、初発菌糸体濃度0.14 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.13 g/L）。

実施例8-2：5日間振盪培養

実施例 1 で製造した培養液を用いて、振盪培養期間を 5 日間とする他は、実施例 2 と同様にして培養液を製造し、次いで、実施例 3 と同様の培養操作を行い、培養液を製造した。この培養液を用いて、更に、200 L 容培養槽で、実施例 7-1 に準じた培養操作を行った。乾燥菌糸体含有量 7 g/L の培養液が得られた。

実施例 8-3 : 3 日間振盪培養

実施例 1 で製造した培養液を用いて、振盪培養期間を 3 日間とする他は、実施例 2 と同様にして培養液を製造し、次いで、実施例 3 と同様の培養操作を行い、培養液を製造した。この培養液を用いて、更に、200 L 容培養槽で、実施例 7-1 に準じた培養操作を行った。乾燥菌糸体含有量 0.5 g/L の培養液が得られた。

比較例 3

30 L 容ジャーファーマンターを用いた、通気しない攪拌培養によるマツタケ菌 (V-1) を含有する培養液が 200 L 容培養槽による深部培養に及ぼした効果：スパージャー装備 30 L 容ジャーファーマンターを用いて培養中に通気して得られた培養液との比較。

比較例 3-1 : マツタケ菌 (IV-1) 培養時に培養液に通気した場合

実施例 1、次いで、実施例 2 で製造した培養液を用いて、スパージャー装備 30 L 容ジャーファーマンターを使用して、2 L/min の通気をする他は、実施例 3 と同様の操作を行い、培養液を製造した。この培養液中の菌糸は凝集していた。培養終了時の乾燥菌糸体含有量は 0.6 g/L で、その内、ファイバー状菌糸体 0.03 g/L であった。この培養液を用いて、更に、200 L 容培養槽で、実施例 7-1 に準じた培養操作を行った。乾燥菌糸体含有量 5 g/L の培養液が得られた。

なお、マツタケ菌 (IV-1) 培養時に培養液に通気しない場合は、実施例 7-1 に示すとおりである。実施例 3 と同様に、30 L 容ジャーファーマンターを用いて、培養液に通気しないで培養した培養液中の菌糸の多くはファイバー状であり、培養終了時の乾燥菌糸体含有量は 1 g/L で、その内、ファイバー状菌糸体 0.95 g/L であった。

接種時及び、培養後のデータは次の通り。

乾燥菌糸体含有量 12 g/L の培養液が得られた。

接種時拡大倍率 7 倍、初発菌糸体濃度 0.14 g/L (その内、ファイバー状菌

糸体 0.13 g/L)。

実施例 9

通気した深部培養によるマツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液の使用量が 200 L 容培養槽による深部培養に及ぼした効果：実施例 4 で得られた培養液の使用量を変えて比較：

実施例 9-1：マツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液を 10 L 接種

実施例 1、実施例 2、実施例 3、次いで、実施例 4 で、マツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液を製造した。

他方、B 型基質を 200 L 容培養槽内で水道水に溶解・滅菌して 130 L の培地を調製した。この 130 L の培地に、マツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液 10 L を接種し、培養液単位体積当たりの攪拌所要動力 0.12 kW/m³、通気量 42 L/min、23±2℃の条件下で、12 日間深部培養した。

乾燥菌糸体含有量 12 g/L の培養液が得られた。

接種時拡大倍率 14 倍、初発菌糸体濃度 0.21 g/L (その内、ファイバー状菌糸体 0.19 g/L)。

実施例 9-2：マツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液を 5 L 接種

実施例 1、実施例 2、実施例 3、次いで、実施例 4 で製造した、マツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液を 5 L 使用し、更に、無菌水を 5 L 使用する他は、200 L 容培養槽で実施例 9-1 に準じた培養操作を行った。乾燥菌糸体含有量 10 g/L の培養液が得られた。

接種時拡大倍率 28 倍、初発菌糸体濃度 0.107 g/L (その内、ファイバー状菌糸体 0.097 g/L)。

実施例 9-3：マツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液を 2 L 接種

実施例 1、実施例 2、実施例 3、次いで、実施例 4 で製造した、マツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液を 2 L 使用し、更に、無菌水を 8 L 使用する他は、200 L 容培養槽で、実施例 9-1 に準じた培養操作を行った。乾燥菌糸体含有量 2 g/L の培養液が得られた。

接種時拡大倍率 70 倍、初発菌糸体濃度 0.043 g/L (その内、ファイバー状菌糸体 0.04 g/L)。

実施例 10

通気した深部培養によるマツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液を母菌に使用して 200 L 容培養槽による深部培養する際の攪拌条件が菌糸体生成に及ぼした効果:

実施例 10-1: 培養液単位体積当たりの攪拌所要動力 0.12 kW/m³

実施例 9-1 に示すとおりである。

接種時及び、培養後のデータは次の通り。

乾燥菌糸体含有量 12 g/L の培養液が得られた。

接種時拡大倍率 14 倍、初発菌糸体濃度 0.21 g/L (その内、ファイバー状菌糸体 0.19 g/L)。

実施例 10-2: 培養液単位体積当たりの攪拌所要動力 1.09 kW/m³

培養液単位体積当たりの攪拌所要動力を 1.09 kW/m³ にする他は、実施例 10-1 と同様に、12 日間深部培養した。

乾燥菌糸体含有量 7 g/L の培養液が得られた。

接種時拡大倍率 14 倍、初発菌糸体濃度 0.21 g/L (その内、ファイバー状菌糸体 0.19 g/L)。

実施例 10-3: 培養液単位体積当たりの攪拌所要動力 2.63 kW/m³ [

培養液単位体積当たりの攪拌所要動力を 2.63 kW/m³ にする他は、実施例 10-1 と同様に、12 日間深部培養したが、12 日後の培養液から乾燥菌糸体含有量を求めることができなかった。

実施例 11

通気した深部培養によるマツタケ菌 (VI-1) を含有している培地を母菌に使用して 200 L 容培養槽による深部培養する際の炭素源の違いが菌糸体生成に及ぼした影響、バレイショデンプンとグルコースとの使用量 (指標としての浸透圧) による比較。

実施例 11-1: 浸透圧 0.05 MPa

実施例 1、実施例 2、実施例 3、次いで、実施例 4 で、マツタケ菌 (VI-1) を含有している培養液を製造した。

他方、C 型基質、バレイショデンプン 9.8 kg 及び、グルコース 140 g を 2

00L容培養槽内で水道水に溶解し、滅菌して、浸透圧0.05MPaの培地130Lを調製した。この130Lの培地に、マツタケ菌(VI-1)を含有している培養液10Lを接種し、培養液単位体積当たりの攪拌所要動力0.12kW/m³、通気量42L/min、23±2℃の条件下で本培養として12日間深部培養した。

乾燥菌糸体含有量14g/Lの培養液が得られた。

接種時拡大倍率14倍、初発菌糸体濃度0.21g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.19g/L）。

実施例11-2：浸透圧0.50MPa

バレিশヨデンプン4.97kg、グルコース4.97kgを使用して、浸透圧0.50MPaの培地130Lを作製する他は、実施例11-1と同様に操作し、12日間深部培養した。

乾燥菌糸体含有量9.5g/Lの培養液が得られた。

接種時拡大倍率14倍、初発菌糸体濃度0.21g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.19g/L）。

実施例11-3：浸透圧0.98MPa

バレিশヨデンプン140g、グルコース9.8kgを使用して、浸透圧0.98MPaの培地130Lを作製する他は、実施例11-1と同様に操作し、12日間深部培養した。

乾燥菌糸体含有量2g/Lの培養液が得られた。

接種時拡大倍率14倍、初発菌糸体濃度0.21g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.19g/L）。

実施例12

振盪培養の攪拌所要動力がマツタケ菌(V)の形状と生育活性に及ぼした効果。

実施例12-1：攪拌所要動力1.6kW/m³

実施例1で製造した培養液を用いて、振盪培養の培養液単位体積あたりの攪拌所要動力を1.6kW/m³とすること以外は、実施例2と同様にしてマツタケ菌(IV-1)乾燥菌糸体3.2g/L（その内、ファイバー状菌糸体2.2g/L）を含有する培養液を製造した。次いでマツタケ菌(IV-1)の接種量を3L（実施例3と初発菌糸体濃度を同等とするため）とする以外は実施例3と同様の培養操作

を行ったところ、30 L容ジャーファーマンターによるマツタケ菌（V-1）から得られた乾燥菌糸体濃度は0.75 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.6 g/L）であった。

接種時拡大倍率6.7倍、初発菌糸体濃度0.48 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.38 g/L）。

次いで、このマツタケ菌（V）を用いて、更に、200 L容培養槽で上記マツタケ菌（V）を20 L接種すること以外は実施例7-1に準じた培養を行った。培養終了時の乾燥菌糸体濃度は9.7 g/Lであった。

実施例12-2：攪拌所要動力2.2 kw/m³

実施例1で製造した培養液を用いて、振盪培養の培養液単位体積あたりの攪拌所要動力を2.2 kw/m³の高速回転とすること以外は、実施例2と同様にしてマツタケ菌（IV-1）乾燥菌糸体2.4 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.013 g/L）を含有する培養液を製造した。次いでマツタケ菌（IV-1）の接種量を4 L（実施例3と初発菌糸体濃度を同等とするため）とする以外は実施例3と同様の培養操作を行ったところ、30 L容ジャーファーマンターによるマツタケ菌（V-1）から得られた乾燥菌糸体濃度は0.5 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.01 g/L）であった。

接種時拡大倍率5倍、初発菌糸体濃度0.48 g/L（その内、ファイバー状菌糸体0.0026 g/L）。

次いで、このマツタケ菌（V）を用いて、更に、200 L容培養槽でマツタケ菌（V）の接種量を20 Lとする以外は実施例7-1に準じた培養を行った。培養終了時の乾燥菌糸体濃度は4.7 g/Lであった。

実施例13

200 L容培養槽によるマツタケ菌（VI）の攪拌所要動力がマツタケ菌（VI）の形状と生育活性に及ぼした効果。

実施例13-1：攪拌所要動力1.7 kw/m³

実施例1、実施例2、及び実施例3でマツタケ菌（V-1）を含有している培養液を製造した。次いで、培養液単位体積あたりの攪拌所要動力を1.7 kw/m³にすること以外は実施例4に準じた培養を行ったところ、200 L容培養槽から乾

乾燥菌糸体含有量 1.6 g/L (その内、ファイバー状菌糸体 1.1 g/L) のマツタケ菌 (VI-1) が得られた。次いで、ここで得られたマツタケ菌 (VI-1) を用いて実施例 9-1 に準じた培養を行ったところ、乾燥菌糸体含有量は 9.7 g/L のマツタケ菌糸体培養液が得られた。

接種時拡大倍率 1.4 倍、初発菌糸体濃度 0.11 g/L (その内、ファイバー状菌糸体濃度 0.78 g/L)。

実施例 13-2: 攪拌所要動力 2.2 kW/m³

実施例 1、実施例 2、実施例 3 でマツタケ菌 (V-1) を含有している培養液を製造した。次いで、培養液単位体積あたりの攪拌所要動力を 2.2 kW/m³ にすること以外は実施例 4 に準じた培養を行ったところ、200 L 容培養槽から乾燥菌糸体含有量 0.68 g/L (その内、ファイバー状菌糸体 0.02 g/L) のマツタケ菌 (VI-1) が得られた。次いで、ここで得られたマツタケ菌 (VI-1) を用いてマツタケ菌 (VI-1) を 25 L 接種する点と、培地調製量を 115 L とする点以外を実施例 9-1 に準じた培養を行ったところ、培養終了時の乾燥菌糸体含有量は 2.5 g/L であった。

接種時拡大倍率 5.6 倍、初発菌糸体濃度 0.12 g/L (その内、ファイバー状菌糸体濃度 0.0036 g/L)。

実施例 14: 大量培養に得られたマツタケ菌糸体におけるナチュラルキラー (NK) 細胞活性の評価

(1) 大量培養に得られたマツタケ菌糸体の凍結乾燥品の調製

実施例 6 で得られたマツタケ菌糸体を遠心濾過機にて遠心分離し、そのケーキ部分を回収した後に、5 mm 角程度に解砕した。解砕したマツタケ菌糸体のブロック (含水率 79.4% W. B.) 6 kg を専用トレー (510 mm × 790 mm) に充填し、-35℃ で 24 時間予備凍結した。なお、「W. B.」は湿潤重量 (wet base) を意味する。予備凍結したマツタケ菌糸体を真空度 13 Pa の減圧条件下で凍結乾燥し、凍結乾燥品 1.2 kg を得た。凍結乾燥時の最高温度は 50℃ であり、凍結乾燥を完了するまで 24 時間を要した。凍結乾燥品の含水率は 2.7% W. B. であった。

得られた凍結乾燥品 1.2 kg を、粉碎機 (ピンミル方式, 5000 r/mi

n) で粉碎し、粉碎品を得た。凍結乾燥品の供給速度は 12 kg/h とし、粉碎時の温度は 50°C 以下に制御した。前記粉碎品の粒度は、 $125 \mu\text{m}$ の篩で 90% が通過する粒度であった。

(2) NK細胞活性の評価

本実施例では、マツタケ菌糸体の有する生理活性として、ストレス負荷に対する促進活性の指標の1つであるNK細胞活性の評価を行った。具体的には、NK細胞活性は、国際公開第WO 02/30440号パンフレットの評価例1に記載の方法（マウスを用いた評価系）により、「 30% 傷害単位 (Lytic Units 30% ; LU30)」、すなわち、エフェクター細胞 10^7 個当たり 30% の腫瘍細胞を傷害する細胞数を算出した後、t-検定により比較した。なお、マツタケ菌糸体粉碎品の投与量は、マウスに対して 150 mg/kg/day (ヒト相当量に換算した場合、 0.6 g/day) であった。

前記実施例14(1)で調製したマツタケ菌糸体の凍結乾燥品には、NK細胞活性が認められ、蒸留水投与系のコントロール群に対する有意差（有意差検定 $P < 0.05$ ）も認められた。

産業上の利用可能性

本発明の製造方法によれば、生理活性を損なうことなく、マツタケ菌糸体を大量に製造することができる。例えば、本発明により、固形培地又は液体培地で、培養又は保存したマツタケ菌を、静置液体培養し、次いで、振盪培養、更に、小スケール培養において（例えば、 100 L 未満の小型培養装置を用い）、液体培地中に通気を行なわない条件下又は 0.05vvm 未満の低通気条件下で攪拌培養を行い製造したマツタケ菌糸体を製造用母菌に用いて、大スケール培養（例えば、 100 L 以上の中型又は大型培養装置）で、深部培養によりマツタケ菌糸体を製造することが可能になった。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. 小スケール培養において、液体培地中に通気を行なわない条件下又は 0.05 vvm 未満の低通気条件下で、マツタケ菌糸体を攪拌培養する工程を含む、マツタケ菌糸体の製造方法。
2. 前記攪拌培養の前培養工程として、
 - (1) マツタケ菌糸体を静置液体培養する工程、
 - (2) マツタケ菌糸体を振盪培養する工程、あるいは、
 - (3) マツタケ菌糸体を静置液体培養し、続いて、前記静置液体培養で得られたマツタケ菌糸体を用いて振盪培養する工程のいずれか1つの工程を更に含む、請求項1に記載の製造方法。
3. 前記攪拌培養工程における培養液単位体積あたりの攪拌所要動力が $0.01 \sim 2 \text{ kW/m}^3$ である、請求項1又は2に記載の製造方法。
4. マツタケ菌糸体を静置液体培養し、続いて、前記静置液体培養で得られたマツタケ菌糸体を用いて振盪培養する工程を含む、マツタケ菌糸体の製造方法。
5. 請求項1～4のいずれか一項に記載の製造方法で得られたマツタケ菌糸体を製造用母菌に用いて、深部培養する工程を含む、マツタケ菌糸体の製造方法。
6. 静置液体培養の期間が、 $30 \sim 400$ 日間である、請求項2～5のいずれか一項に記載の製造方法。
7. 振盪培養の期間が $5 \sim 50$ 日間である、請求項2～6のいずれか一項に記載の製造方法。
8. 接種時拡大倍率 $2 \sim 50$ 倍の拡大培養である、請求項1～7のいずれか一項に記載の製造方法。
9. 培養液の浸透圧を $0.01 \sim 0.8 \text{ MPa}$ に調製した培地を用いる、請求項1～8のいずれか一項に記載の製造方法。
10. 初発菌糸体に含有されるファイバー状菌糸体の初発菌糸体濃度が 0.05 g/L 以上である、請求項1～9のいずれか一項に記載の製造方法。

1/5

FIG. 1

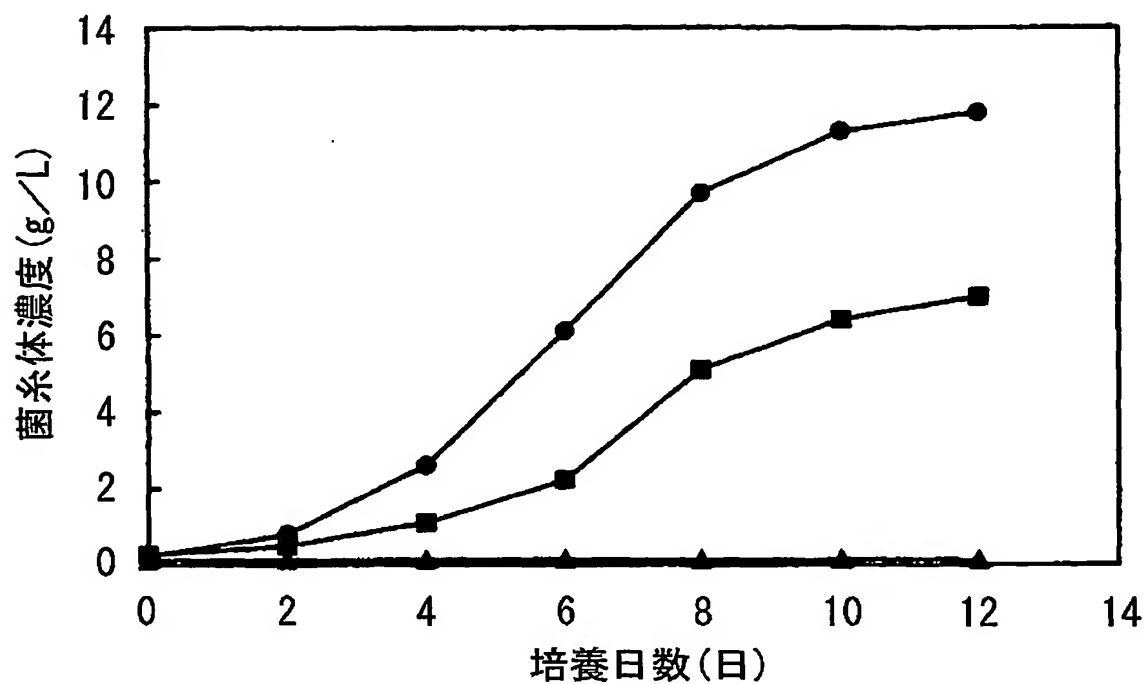
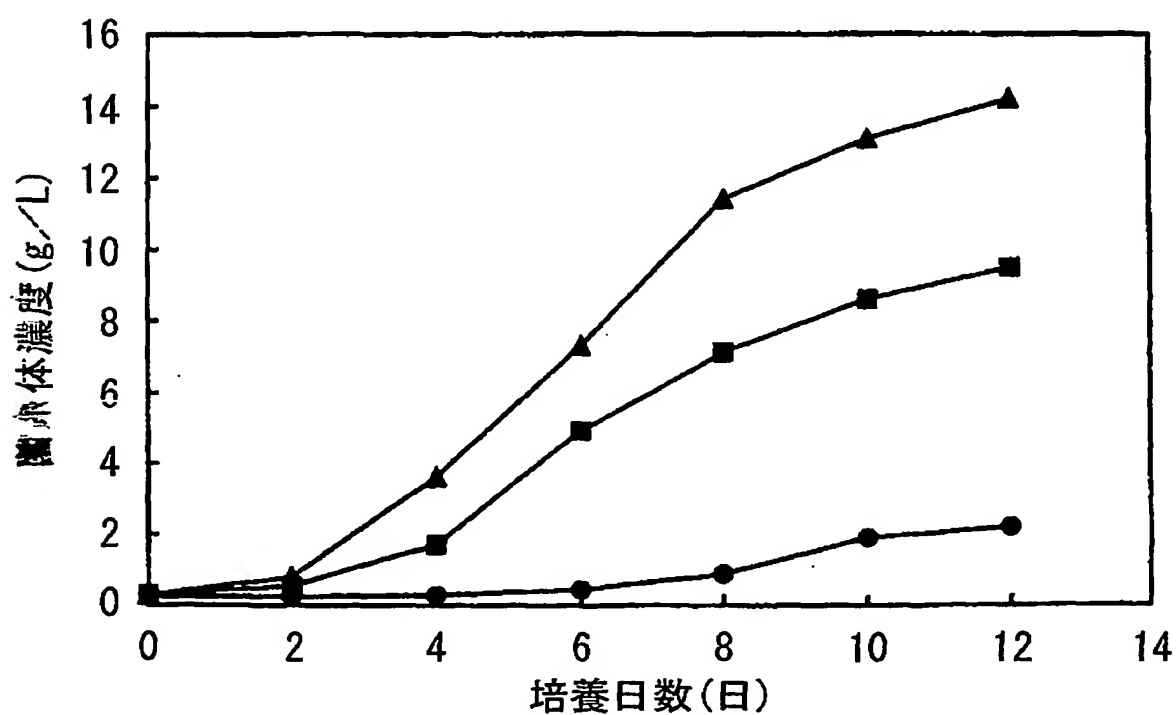
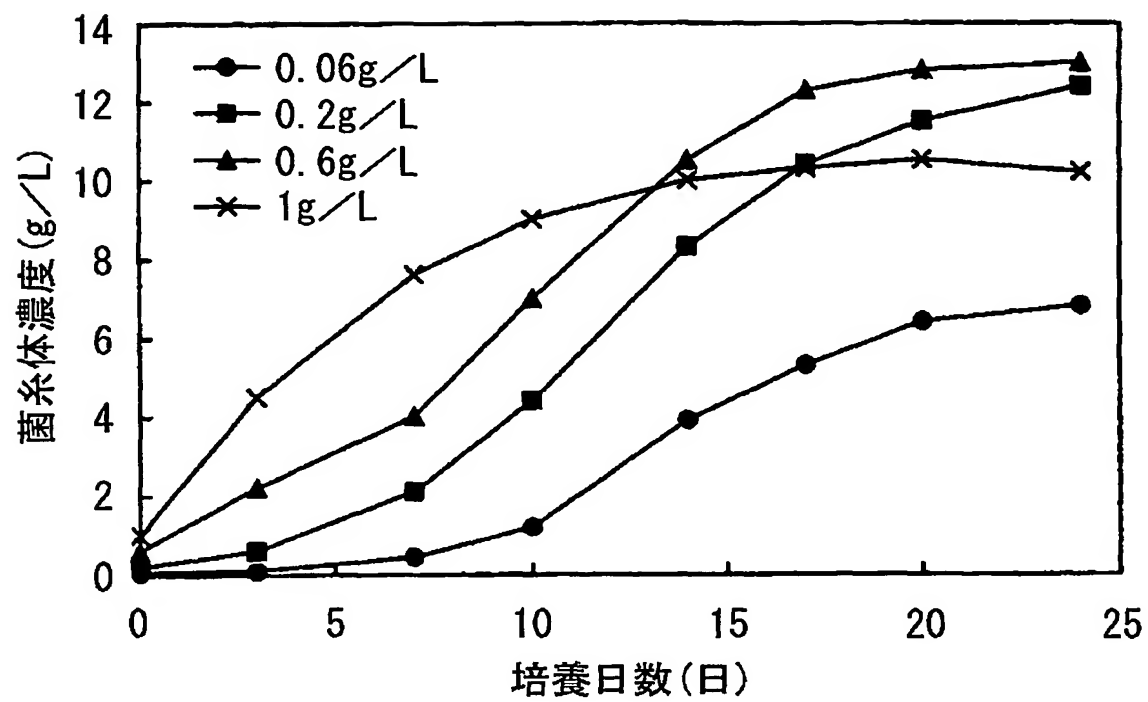


FIG. 2



2/5

FIG. 3



3/5

FIG. 4

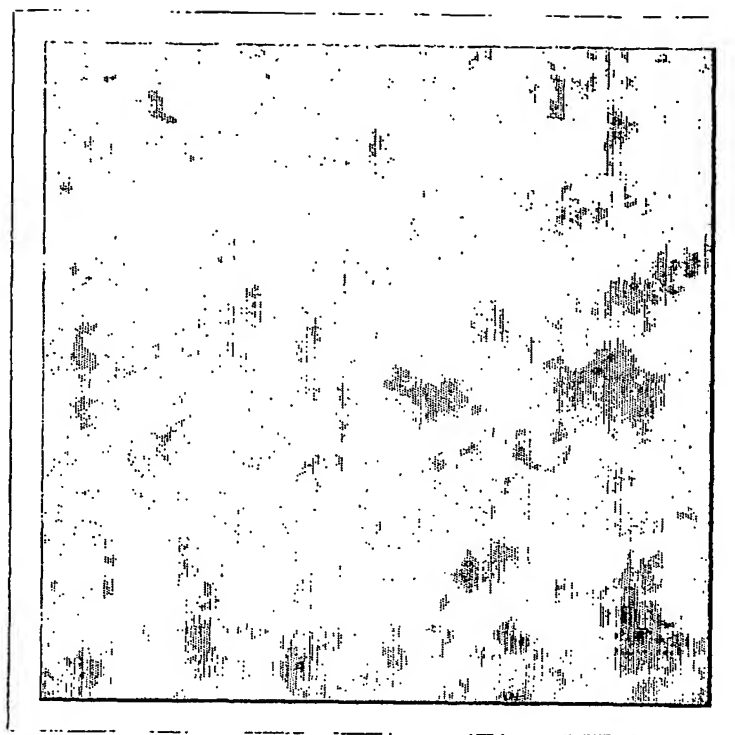
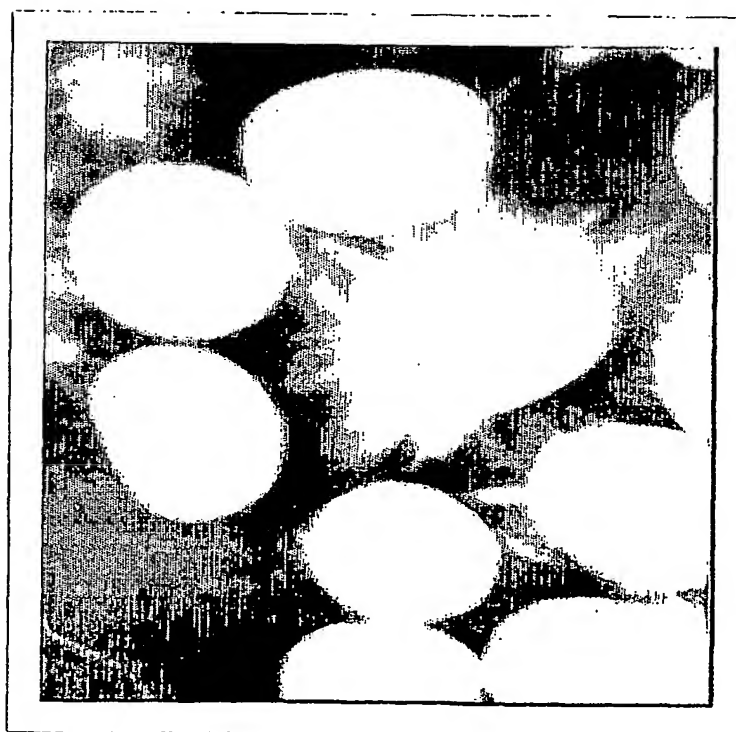


FIG. 5



4/5

FIG. 6

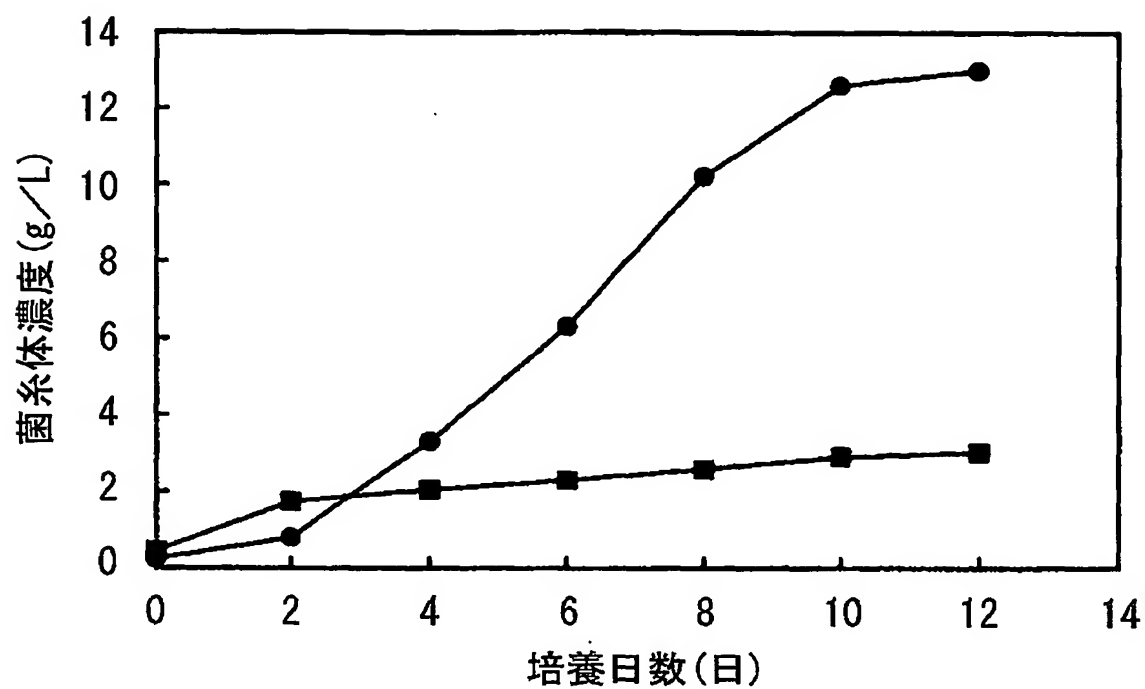
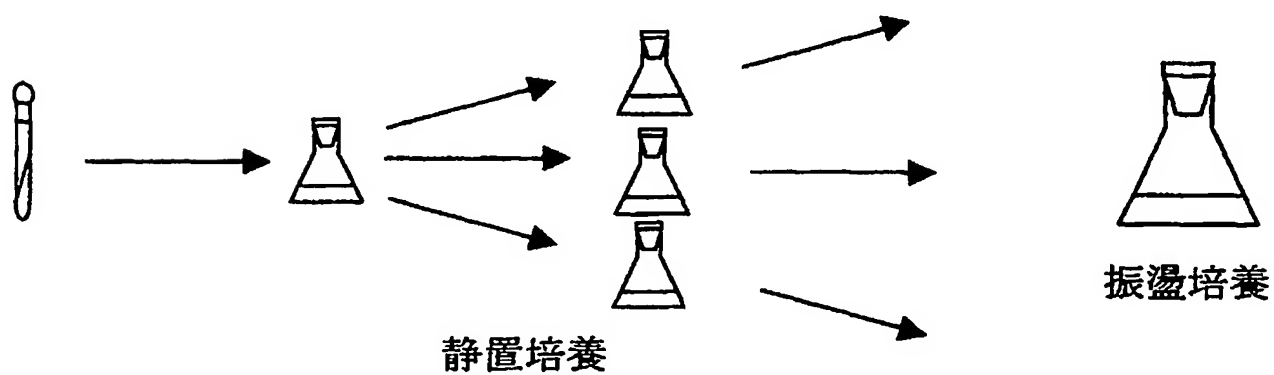


FIG. 7



5/5

FIG. 8

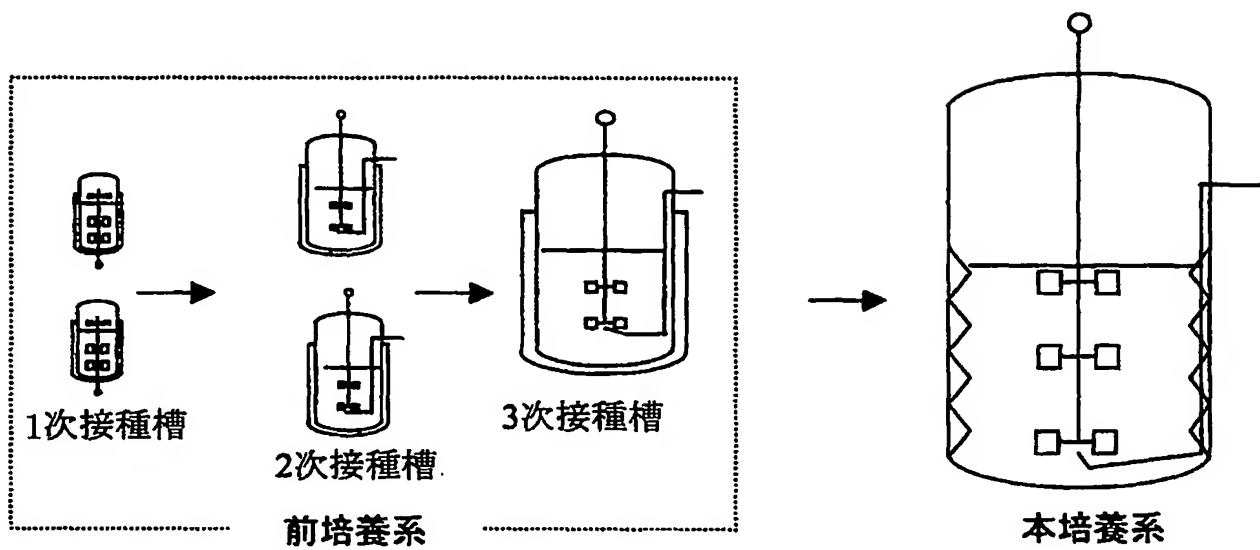
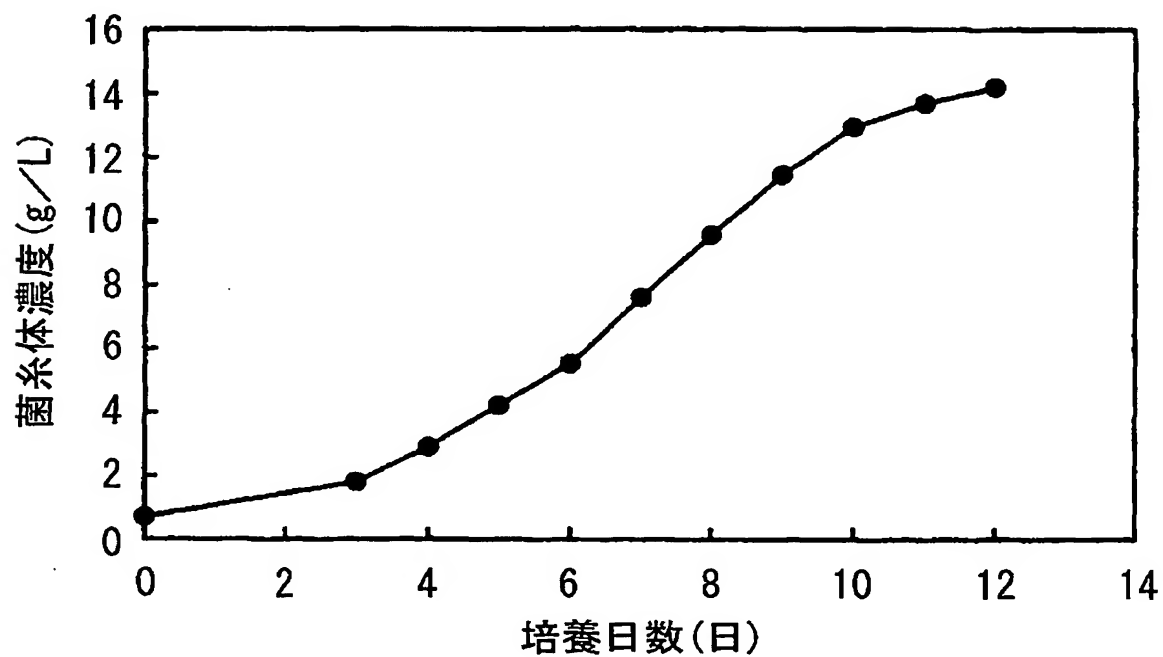


FIG. 9



VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 呉羽化学工業株式会社は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付：	2003年08月12日（12.08.2003）
VIII-5-1 (iii)	開示の名称：	「バイオインダストリー」，2003年，第20巻，第9号
VIII-5-1 (iv)	開示の場所：	， p. 37-46
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。：	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13657

10/532617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/00-3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 55-118389 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 15 November, 1980 (15.11.80), Full text (Family: none)	1-10
X	JP 11-318433 A (Toshimitsu HATTORI), 24 November, 1999 (24.11.99), Full text (Family: none)	1-10
A	JP 7-23772 A (KUREHA CHEM. IND. CO., LTD.), 27 January, 1995 (27.01.95), Full text (Family: none)	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 December, 2003 (16.12.03)Date of mailing of the international search report
13 January, 2004 (13.01.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal application No.

PCT/JP03/13657

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/30440 A1 (KUREHA CHEM. IND. CO., LTD.), 18 April, 2002 (18.04.02), Full text & AU 200194210 A & EP 1331009 A1 & US 2003/0180901 A1 & KR 2003046495 A	1-10
A	KAWAGOE, M. et al., Submerged Culture of Tricholoma matsutake Mycelium in Bubble Column Fermentors, J.Biosci.Bioeng., (1999), Vol.87, No.1, pages 116 to 118	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 1/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 1/00-3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JSTplus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 55-118389 A (武田薬品工業株式会社) 1980. 11. 15, 全文 (ファミリーなし)	1-10
X	JP 11-318433 A (服部利光) 1999. 11. 24, 全文 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 7-23772 A (呉羽化学工業株式会社) 1995. 01. 27, 全文 (ファミリーなし)	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (補正を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 12. 03

国際調査報告の発送日

13.01.04

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 02/30440 A1 (KUREHA CHEM IND CO LTD) 200 2.04.18, 全文 & AU 200194210 A & EP 1331009 A1 & US 2003/0180901 A1 & KR 2003046495 A	1-10
A	KAWAGOE, M. et al., Submerged Culture of Tricholoma matsutake Mycelium in Bubble Column Fermentors, J Biosci. Bioeng. (1999) Vol. 87, No. 1, p. 116-118	1-10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.